

Determinazione qualitativa e semi-quantitativa di anticorpi anti-Treponema Pallidum. Emoagglutinazione in Micropiastra.

**REF** RT1023 R1: 1x15 mL + R2: 1x15 + R3: 1x45 mL + R4: 1x1 mL + R5: 1x1 mL

## METODO E PRINCIPIO

TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination) è un test di emoagglutinazione specifico per il rilevamento qualitativo e semiquantitativo di anticorpi anti T. Pallidum nel siero umano. Eritrociti di pollo stabilizzati, sensibilizzati con una soluzione antigenica di T. pallidum, agglutinano in presenza di anticorpi anti T. Pallidum secondo un preciso pattern.

## SIGNIFICATO CLINICO

Il Treponema pallidum è uno Spirochet, cioè un lungo bacillo spiraliforme che causa la sifilide, un'infezione trasmessa per via sessuale (forma acquisita) o attraverso la placenta di madre luetica (forma congenita). La forma congenita della sifilide può trasmettersi dalla gravida a partire dalla 16° settimana di gravidanza quando i treponemi, superata la barriera placentare, raggiungono il feto. In assenza di cure la sifilide si sviluppa tipicamente in tre fasi.

Dopo un periodo di incubazione di circa 1 mese si osserva la fase primaria (compaiono le prime lesioni nell'area dei genitali esterni che guariscono nell'arco di 2 mesi). Si osserva quindi uno stadio secondario, che completa tipicamente la sua fase entro 2 anni, al termine dei quali la malattia entra in fase di latenza non infettiva e che può mantenersi tale per tutto l'arco della vita. Occasionalmente, anche dopo decenni dal contagio, può subentrare la temuta fase terziaria, quella più pericolosa in quanto in grado di provocare lesioni serie. Nel caso di donne gravide con positività al TPHA, la probabilità di trasmissione al feto dipende dallo stadio della malattia. In assenza di trattamento è molto alta in caso di sifilide primaria o secondaria, scende al 40% circa nel caso di sifilide nelle prime fasi di latenza ed al 10% circa se la sifilide è latente. Il TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Assay) è un test treponemico in cui gli anticorpi anti-treponema vengono evidenziati tramite agglutinazione di emazie sensibilizzate con antigeni specifici. Il test si positivizza dopo circa 5 settimane dal contagio e rimane per sempre positivo sia nei soggetti trattati che in quelli non trattati.

Il TPHA è il test di elezione per individuare l'esordio della malattia. Tale esame tende tuttavia a restare positivo anche quando la malattia è stata efficacemente contrastata con gli antibiotici e comunque anche durante la fase secondaria. In caso di positività al test TPHA è necessario confermare l'infezione con test di conferma quali FTA-abs e Immunoblotting.

## COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

**Reagente R1:** Sospensione Cellule Test. Emazie di pollo stabilizzate e coattate con antigeni ricombinanti di T. Pallidum, pH 7,2. - 1x15 mL

**Reagente R2:** Sospensione Cellule Controllo. Emazie di pollo stabilizzate e non coattate, pH 7,2. - 1x15 mL.

**Reagente R3 (diluente):** Soluzione salina tamponata contenente antigeni solubili di T. Reiter, pH 7,2. - 1x45 mL

**Reagente R4:** Controllo positivo (da coniglio), prediluito 1:20. - 1x1 mL.

**Reagente R5:** Controllo negativo. Siero animale prediluito 1:20. - 1x1 mL.

## STABILITA' DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza indicata, se conservati come indicato sull'etichetta e contaminazione evitata, evaporazione ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti. Dopo aver aperto i flaconi, è consigliabile utilizzarli il prima possibile, quindi chiudere immediatamente le bottiglie e conservarle in frigorifero per evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

## CAMPIONI

Utilizzare campioni di siero puliti freschi, senza fibrina. Il plasma, il siero lipemico o la contaminazione microbica possono causare risultati errati. Analizzare subito o conservare il campione a +2 a + 8 ° C per un massimo di 7 giorni oppure congelare il siero fino a 3 mesi a -20°C. I campioni con

presenza di fibrina devono essere centrifugati prima di essere testati.

## PROCEDURA

Il test viene eseguito in micropiastre a pozzetto a U (accessorio non fornito nel kit).

Portare i reagenti e i campioni del test a temperatura ambiente.

Agitare vigorosamente le fiale di sospensione delle cellule (R1 e R2) prima dell'uso.

### Test qualitativo

Questa procedura è solo per i campioni perché devono essere diluiti 1:20. I controlli sono prediluiti 1:20, per il loro uso vedere il paragrafo Controllo Qualità. Ogni test richiede 3 pozzetti della micropiastra.

1. Pipettare 190 µL di Diluente (R3) nel pozzetto 1.
2. Pipettare 10 µL di campione nel pozzetto 1 (diluizione 1:20).
3. Miscelare e trasferire 25 µL di campione diluito dal pozzetto 1 al pozzetto 2 e pozzetto 3.
4. Pipettare 75 µL di Sospensione Cellule Controllo (R2) nel pozzetto 2.
5. Pipettare 75 µL di Sospensione Cellule Test (R1) nel pozzetto 3.
6. Toccare delicatamente la piastra per mescolare.
7. Coprire i pozzetti e incubare a t. a. per 45-60 minuti.
8. Esaminare macroscopicamente i pattern di agglutinazione delle cellule.

### Letture e interpretazione

Leggere i risultati confrontando i pattern di agglutinazione della Sospensione Cellule Test con la Sospensione Cellule Controllo.

Le letture sono valutate e riportate secondo i seguenti criteri:

GRADO EMOAGGLUTINAZIONE	LETTURA	RISULTATO
Pannello di cellule che ricopre omogeneamente tutto il fondo del pozzetto	4+	Reattivo
Pannello di cellule che ricopre omogeneamente parte del fondo del pozzetto	3+	Reattivo
Pannello di cellule ma circondato da cerchio rosso.	2+	Reattivo
Pannello di cellule che copre meno area ed è circondata da piccolo cerchio rosso.	1+	Reattivo
Bottoni di cellule con piccolo foro centrale		Borderline
Bottoni compatti di cellule a volte con piccolo foro nel centro	-	Negativo

- Qualsiasi pattern di agglutinazione mostrato dalla Sospensione Cellule Controllo indica la presenza di anticorpi non specifici ed il campione non può essere interpretato.
- I campioni con un pattern borderline dovrebbero essere ritestati e riportati come negativi se lo stesso pattern è riprodotto.
- I campioni reattivi devono essere titolati seguendo il metodo semi quantitativo.

### Test Semi-quantitativo

Ogni test richiede 8 pozzetti. I controlli inclusi nel kit devono essere testati solo in modalità qualitativa. Testare in modalità semi-quantitativa solo i campioni che erano risultati reattivi nel test qualitativo.

1. Pipettare 190 µL di Diluente (R3) nel pozzetto 1.
2. Pipettare 10 µL di campione nel pozzetto 1 (diluizione 1:20).
3. Pipettare 25 µL di Diluente (R3) dal pozzetto 2 a 8 di una micropiastra.
4. Trasferire 25 µL dalla diluizione 1:20 del pozzetto 1 al pozzetto 2
5. Mescolare bene e trasferire 25 µL dal pozzetto 2 al pozzetto 3 e ripetere fino al pozzetto 8 (diluizione 1:40 - 1:80 - 1:160 - 1:320 - 1:640 - 1:1280 - 1:2560).
6. Eliminare gli ultimi 25 µL dal pozzetto 8.
7. Pipettare 75 µL di Sospensione Cellule Test (R1) nei pozzetti da 1 a 8.
8. Toccare delicatamente la piastra per mescolare.
9. Coprire i pozzetti e incubare a temperatura ambiente per 45-60 minuti. (Nota 2).

## Letture e interpretazione

Come nel test qualitativo. Il titolo del campione è riportato come la massima diluizione che mostra reattività. La successiva diluizione più alta dovrebbe essere negativa.

## CONTROLLO QUALITA'

Utilizzare i controlli di **MTD Diagnostics** inclusi nel kit. I Controlli Positivo e Negativo sono già prediluiti alla diluizione 1:20. Miscelare in due differenti pozzetti 25 µL di ogni controllo con 75 µL di Sospensione Cellule Test (R1) e procedere come descritto nella procedura Test Qualitativo (punti da 6 a 8). Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna agglutinazione sia con Cellule Test che Cellule Controllo. Il Controllo Positivo deve mostrare un pattern di agglutinazione con le sole Cellule Test.

## VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Non Reattività.

## PRESTAZIONI

Sensibilità Analitica: La sensibilità del Reagente è calibrata contro il 1st International Standard for Syphilitic Serum (WHO).

Effetto Prozona: Nessun effetto fino ad un titolo di 1:163840 (Nota 5).

Sensibilità Diagnostica: 99,6%

Specificità Diagnostica: 100 %

## INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Emoglobina (<1 g/dL), Bilirubina (<20 mg/dL), Lipemia (<1000 mg/dL) e Fattore Reumatoide non interferiscono. Altre sostanze possono interferire.

## NOTE

1. Il test TPHA non discrimina anticorpi anti T. Pallidum da anticorpi anti altri treponemi patogeni. Si raccomanda di confermare tutti i risultati positivi con il metodo alternativo FTA-Abs.
2. Falsi positivi sono stati descritti in pazienti con mononucleosi, lebbra, borreliosi, malattie autoimmuni e tossicodipendenza.
3. Falsi negativi possono verificarsi in caso di sifilide attiva precoce o sifilide latente tardiva. Completare il profilo dei risultati con il test cardiolipina (RPR o VDRL) in caso di sifilide attiva.
4. Il TPHA non è utile per il monitoraggio terapeutico, poiché il livello degli anticorpi rimane stabile per molto tempo dopo che la malattia è stata curata clinicamente.
5. La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sui risultati di un singolo risultato del test, ma dovrebbe integrare sia i dati clinici che quelli di laboratorio.
6. La sensibilità del test può essere ridotta a basse temperature. I migliori risultati si ottengono a 15-25 ° C.
7. Tenere la micropiastra lontana dalle vibrazioni, dal calore e dalla luce solare diretta.
8. Il modello di agglutinazione delle cellule di controllo non deve essere utilizzato come riferimento per risultati negativi poiché le cellule di controllo

forniscono un bottone più compatto rispetto alle cellule del test.

9. Il seguente protocollo può essere utilizzato per rimuovere reazioni non specifiche: aggiungere 10 µL del campione a 190 µL di cellule di controllo (R2). Mescolare e incubare per 30 minuti. Centrifugare a 2000 r.p.m. per 3 minuti e testare il supernatante come campione senza precedente diluizione 1:20.
10. I sieri con un alto livello di anticorpi possono dare modelli di agglutinazione con bordi molto piegati.
11. Non leggere i risultati dopo 60 minuti.
12. La contaminazione batterica di controlli e campioni nonché il congelamento e lo scongelamento dei reagenti di sospensione cellulare possono portare a risultati errati.
13. Le piastre per microtitolazione riutilizzate possono dare risultati errati.

## PRECAUZIONI

Le miscele presenti nei reagenti sono di origine animale e non sono in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché nessun metodo può fornire la certezza assoluta che agenti infettivi o altri microbi siano assenti, questo prodotto deve essere maneggiato come materiale potenzialmente biologicamente pericoloso in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

I prodotti non contengono altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP) ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Pertanto, essi non sono soggetti alla etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. I prodotti sono etichettati secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorché maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.



S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'fortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

## SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
<b>REF</b>	Numero di catalogo		Scadenza
<b>LOT</b>	Numero di lotto		Fabbricante

## BIBLIOGRAFIA

- Larsen Sandra A, et al. Clinical Microbiology Reviews 8: 1-21 (1995).  
 Sequeira P.J.L. Br J Vener Dis 59: 145-150 (1983).  
 Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 19: 305-308 (1967).